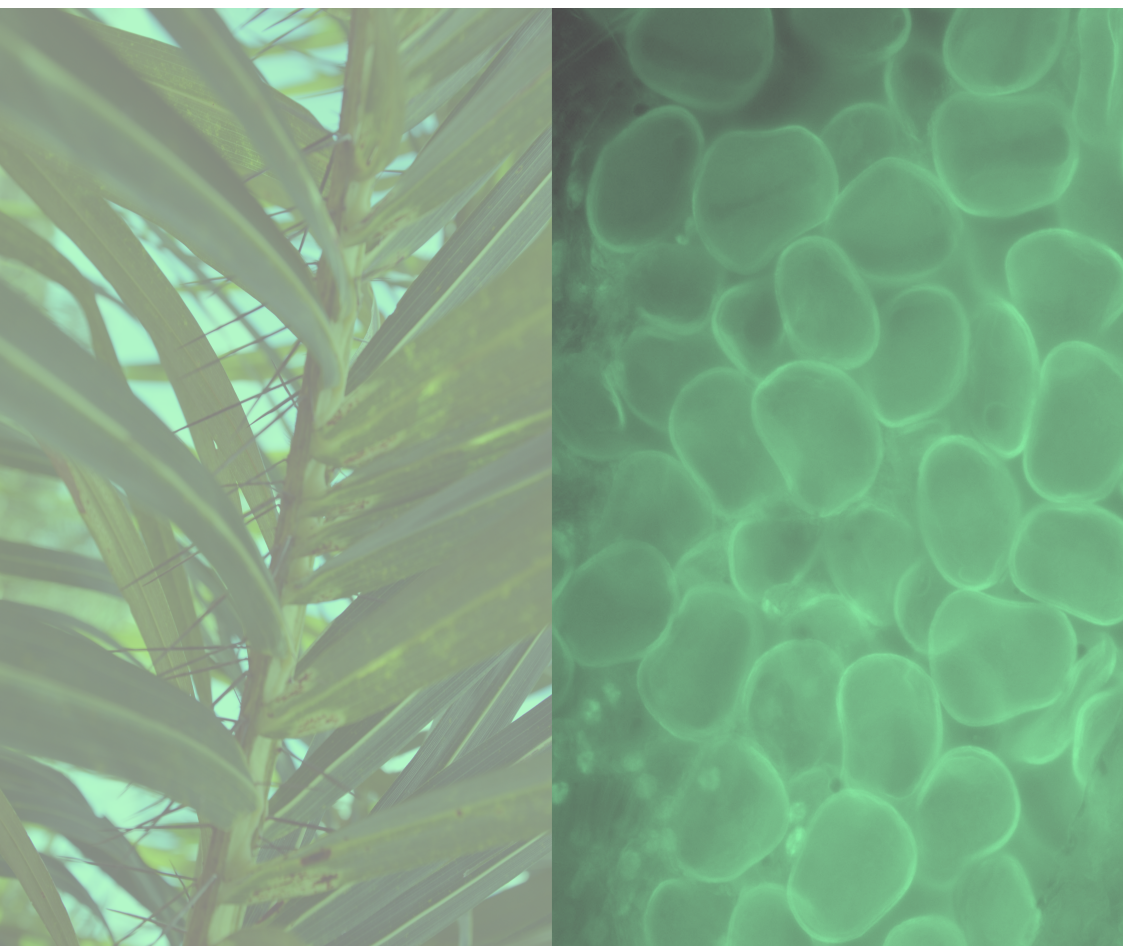


## Anais "Encontro sobre Metabolômica"



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroenergia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

# **Documentos 09**

## **Anais “Encontro sobre Metabolômica”**

*Patrícia Verardi Abdelnur*  
Editora Técnica

Embrapa Agroenergia  
Brasília, DF  
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agroenergia**

Parque Estação Biológica, PqEB s/n, Brasília, DF

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.cnpae.embrapa.br

sac@cnpae.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Anna Leticia M. T. Pighinelli

Membros: Alice Medeiros de Lima, Larissa Andreani, Leonardo

Fonseca Valadares.

Supervisão editorial: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Revisão de texto: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Normalização bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado

Editoração eletrônica: Maria Goreti Braga dos Santos

Foto(s) da capa: Patrícia Abdelnur e Goreti Braga

**1ª edição**

1ª impressão (2012): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Agroenergia**

---

E 56 ENCONTRO SOBRE METABOLÔMICA (2011 : Brasília, DF).

Anais do Encontro Sobre Metabolômica, Brasília, DF, 14 de dezembro de 2011 /  
editora técnica Patrícia Verardi Abdelnur. – Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011.  
41 p. – (Documentos / Embrapa Agroenergia, ISSN 2177- 4439 ; 09)

1. Metabolômica – técnicas analíticas. 2. Metabolômica – principais gargalos. 3.  
Metabolômica – grupos de trabalho. I. Abdelnur, Patrícia Verardi. II. Título. III. Série.

541.222 – CDD

# **Autores**

## **Reinaldo Almeida**

Advion BioSciences, Harlow, UK almeidar@advion.com, University of Southern Denmark, Odense, Denmark real@bmb.sdu.dk

## **Gabriela Gebrin Cezar**

Stemina Biomarker Discovery and University of Wisconsin-Madison – USA, gcezar@b-c.com

## **Rodrigo R. Catharino**

DSc., Laboratório de Biomarcadores Inovare, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, rrc@fcm.unicamp.br

## **Silas Granato Villas-Bôas**

School of Biological Sciences, The University of Auckland - New Zealand, s.villas-boas@auckland.ac.nz

## **Adriano Nunes-Nesi**

Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa – Brasil - nunesnesi@ufv.br



**Carlos Alberto Labate**

Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas,  
Departamento de Genética, Escola Superior de  
Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São  
Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, calabate@esalq.usp.  
br

**Amadeu Hoshi Iglesias**

Waters Technologies do Brasil, São Paulo, SP,  
Brasil, Amadeu\_Iglesias@waters.com

# **Apresentação**

A Embrapa Agroenergia realizou, em 14 de dezembro de 2011, um “Encontro sobre Metabolômica”, com o objetivo de reunir pesquisadores, estudantes e profissionais que trabalham ou têm interesse nesta área, no Brasil e exterior, para discutir os seguintes pontos: i) o que tem sido feito atualmente no tema; ii) quais os grupos que trabalham atualmente nesta área; iii) quais as técnicas analíticas mais utilizadas; e iv) quais os gargalos principais para o desenvolvimento da metabolômica.

A metabolômica, que pode ser definida como a tecnologia voltada para o fornecimento de uma visão geral compreensiva qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo, iniciou-se no ano de 2000 e vem sendo utilizada por poucos grupos de pesquisas do mundo. Entretanto, essa plataforma vem se expandindo nos últimos anos e apresenta excelentes perspectivas futuras, por ser uma técnica poderosa na análise de metabólitos primários e/ou secundários em um organismo, fornecendo informações detalhadas das vias metabólicas de um sistema biológico. Estas informações podem ser integradas aos dados de genoma, transcriptoma e proteoma, gerando, portanto, informações mais completas do sistema biológico global de um organismo, denominado recentemente como Biologia Sistêmica (Systems Biology).

No “Encontro sobre Metabolômica”, foram apresentadas palestras por pesquisadores brasileiros e estrangeiros e os resumos das apresentações foram preparados por seus respectivos autores e encontram-se dispostos neste volume.

A Chefia e a Comissão Organizadora do “Encontro sobre Metabolômica” agradecem aos participantes do evento, e, especialmente, aos palestrantes, por apresentarem contribuições de alto nível científico e tecnológico, por compartilharem suas experiências nesta área tão nova e desafiadora e por disponibilizarem os resumos de suas apresentações, o que possibilitou a edição deste volume de Anais.

*Manoel Teixeira Souza Júnior*  
Chefe-Geral

# Sumário

Combination LC-MS and fraction collection for accurate metabolite annotation .....	9
Metabolômica: descoberta e validação de novos biomarcadores aplicáveis à saúde humana e à agricultura	11
Bioprospecção de Biomarcadores a partir das novas plataformas “Ômicas” .....	24
Determinação da atividade de vias metabólicas a partir do perfil metabólico celular .....	28
Aplicações da metabolômica em fisiologia molecular de plantas.....	31
Metabolic profile of sugarcane during the stage of sucrose maturation in the stem .....	34
Soluções em Espectrometria de Massas e Análise de Dados Waters em Análises Metabolômicas .....	38
Conclusões e Perspectivas .....	41



# Combination LC-MS and fraction collection for accurate metabolite annotation

---

*Reinaldo Almeida*

Metabolomics is an integral part of many life science studies ranging from disease diagnostics to systems biology. However, a number of problems such as the discrimination of biological from non-biological signals, efficient compound annotation, and reliable quantification are still not satisfactorily solved in untargeted LC-MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) -based metabolomics research. New separation technologies such as UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) have increased method sensitivity and analysis speed, and in combination with FTICR-MS (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*) offer solutions to a number of the above mentioned problems. At the other hand fast chromatography and Ultra-High Resolution Mass Spectrometry is difficult to combine due to the MS scan speed. Furthermore, metabolite structural determination often relies on off-line and information dependent MS<sup>n</sup> experiments. Fraction collection followed by nano-ESI (*Electrospray Ionization*) infusion can overcome these issues, enhancing sensitivity and improves metabolite characterization. The TriVersa NanoMate combines a robotic platform for sample delivery and a chip based *nanoelectrospray* emitter in one integrated system. It enables beside automated Direct Infusion at low flow rates, the online-coupling to HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*)

systems and parallel fraction collection. Selected applications from the metabolomics field using this strategy are highlighted as well as the LESA option (*Liquid Extraction Surface Analyses*) a new surface-oriented MS method analyses technique where a liquid micro junction surface sampling probe is used to extract the analyte directly from a surface.

# Metabolômica: descoberta e validação de novos biomarcadores aplicáveis à saúde humana e à agricultura

---

*Gabriela Gebrin Cezar*

## Introdução

O metaboloma é a coleção de todos os compostos químicos de baixo peso molecular (ácidos graxos, açúcares, aminoácidos e outros metabólitos) presentes em células, tecidos ou biofluidos, como urina, sangue e líquido cerebro-espinhal. Pode também ser visto como uma “impressão digital bioquímica”, medida através de plataformas de química analítica de alta resolução, como por exemplo, a espectrometria de massas *electrospray ionization quadrupole time-of-flight (ESI-QTOF)* que utilizamos em nossos estudos. Em nossos processos, pequenas moléculas ou metabólitos presentes em células ou tecidos são inicialmente separadas por cromatografia líquida sob alta pressão (UPLC – *Ultra High Performance Liquid Chromatography*), e posteriormente ionizadas e detectadas por espectrometria de massas em concentrações nanomolares ou picomolares. A confirmação da identidade química de metabólitos é posteriormente efetuada por fragmentação iônica ou MS/MS, para verificar se a fragmentação de metabólitos é idêntica ao padrão de fragmentação de químicos referência, assim como seu tempo de retenção e massa. Uma das principais vantagens da metabolômica como uma plataforma de alta precisão e *high-throughput*, é a sua capacidade



de detectar alterações simultâneas a milhares de pequenas moléculas e suas rotas metabólicas moleculares em resposta a insultos biológicos (como doenças ou estímulos exógenos) ou a uma manipulação genética, por exemplo.

A metabolômica, no entanto, é uma plataforma molecular complexa, uma vez que integra química analítica de última geração (ESI-QTOF) com análise quimiométrica de dados e modelagem bioinformática (baseada na integração de análise estatística univariada e multivariada e construção de modelos de reconhecimento de padrões baseados em métodos como *PLSDA*, *Partial Least Square Discriminant Analysis*, *PCA*, *Principal Component Analysis*, e outros). No entanto, a metabolômica revela marcadores biológicos que são, em nossa opinião, indicadores mais próximos ao fenótipo em questão do que outros sistemas de análise do tipo “oma” (seja este fenótipo uma desordem de saúde humana ou uma característica produtiva de uma cultura bioenergética, por exemplo). Isto se deve ao fato de que os alvos biológicos medidos pela metabolômica, isto é as pequenas moléculas ou metabólitos, participam diretamente dos fenótipos em questão, como intermediários bioquímicos. Neste contexto fenotípico, outros “omas”, como por exemplo, o transcriptoma, gera um volume bastante complexo de informações que podem não ser correlacionadas ou mesmo correlacionáveis ao fenótipo em estudo.

A seguir relatamos algumas aplicações da metabolômica para a geração de conhecimento e produtos relacionados a mecanismos moleculares relevantes para a saúde humana e para a agricultura.

## **Aplicações da metabolômica para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos em desordens do neurodesenvolvimento humano**

A neurogênese humana depende de eventos bioquímicos “orquestrados”. Disfunções cognitivas e algumas doenças de comportamento podem ser manifestações de alterações estritamente bioquímicas no cérebro. O metabolismo e suas perturbações têm um papel inquestionável

durante o neurodesenvolvimento e a patogênese de algumas de suas desordens, tais como o autismo (GASPAR et al., 2003). Neste sentido, a metabolômica oferece um *insight* funcional para esclarecer o mecanismo molecular de alterações ao neurodesenvolvimento humano, uma vez que a metabolômica mede *endpoints* bioquímicos (metabólitos). O início e o progresso de desordens do neurodesenvolvimento humano não podem ser monitorados clinicamente devido ao seu desenvolvimento intrauterino ao contrário, por exemplo, de lesões neurotóxicas em adultos. Um dos principais focos de nossas pesquisas (CEZAR et al., 2007; CEZAR; DONLEY, 2008; PALMER et al., 2012) é a proposta de que a metabolômica associada à neurogênese a partir de células-tronco embrionárias poderia ser uma alternativa inovadora para superar tais limitações, facilitando a nossa análise dos mecanismos moleculares que participariam da patogênese de algumas desordens do neurodesenvolvimento, como a síndrome do álcool fetal ou o autismo. Em outras palavras, utilizamos a habilidade de células tronco embrionárias em recapitular o neurodesenvolvimento humano de maneira fisiologicamente relevante e identificamos perturbações moleculares durante o processo de neurogênese humana através metabolômica. A seguir, descrevemos alguns destes estudos em maiores detalhes.

O tratamento de pacientes com o fármaco antiepilético valproato ou ácido valpróico é geralmente mantido durante a gestação de pacientes epiléticas, visto que episódios convulsivos nas pacientes grávidas são considerados de alto risco para o feto. No entanto, o desenvolvimento do sistema nervoso central fetal é particularmente sensível a efeitos adversos da administração do valproato. Especificamente, a exposição pré-natal ao valproato aumenta a prevalência de espinha bífida e defeitos de formação do tubo neural em recém-nascidos em cerca de 10 a 20 vezes (BJERKEDAL et al., 1982), afetando ainda a função cognitiva pós-natal e fazendo com que o valproato seja reconhecido epidemiologicamente como um agente indutor de autismo (RASALAM et al., 2005). Estudos em animais demonstraram que o valproato afeta eventos chave durante

a neurogênese, tais como proliferação, migração, crescimento de axônios, diferenciação e sinaptogênese (WYSZYNSKI et al., 2005). Os efeitos metabólicos do valproato durante o neurodesenvolvimento, no entanto, são desconhecidos. Como mencionado anteriormente, o neurodesenvolvimento humano é recapitulado de uma maneira reprodutível e fiel através da diferenciação de células tronco embrionárias (ZHANG et al., 2001; BEN-HUR et al., 2004; LI et al., 2005; KEIRSTEAD et al., 2005). Até mesmo a duração dos processos de diferenciação de neurônios e células da glia a partir de precursores neurais é similar à diferenciação destas linhagens celulares *in vivo* (ZHANG, 2006; KEIRSTEAD et al., 2005). Como os processos metabólicos moleculares são intrínsecos à neurogênese humana, propomos, em nosso estudo pioneiro que a diferenciação de células-tronco embrionárias é um modelo fisiologicamente relevante para examinar os efeitos metabólicos do valproato durante o neurodesenvolvimento humano (CEZAR et al., 2007). Nessa publicação detectamos alterações significativas a metabólitos de glutamato e de outros neurotransmissores como a serotonina em precursores neurais e neurônios tratados com valproato. Perturbações ao metabolismo de glutamato já haviam sido descritas no cerebelo de pacientes autistas, independente de exposição intrauterina ao valproato (PURCELL et al., 2001; FATEMI et al., 2002), portanto conseguimos demonstrar que, para algumas rotas metabólicas alteradas descobertas por metabolômica em estudos *in vitro* (glutamato, serotonina, GABA, entre outros), existe uma correlação biológica com achados *in vivo* em pacientes.

O estabelecimento de modelos *in vitro* de desordens do neurodesenvolvimento e a descoberta e validação de pequenas moléculas alteradas de maneira significativa nestes modelos via metabolômica (CEZAR et al., 2007), permitiram a elaboração de hipóteses que estão sendo agora testadas em tecidos humanos (por exemplo, amostras de cérebro *post-mortem* de pacientes autistas versus indivíduos não autistas, do programa Autism Tissue Program, nos Estados Unidos, e

em biofluidos de pacientes) para a descoberta e desenvolvimento de novos biomarcadores para o diagnóstico destas desordens. Além de possibilitar o estabelecimento de novos e mais sensíveis diagnósticos, a metabolômica aplicada a amostras de cérebros *post-mortem* revela as diferenças bioquímicas gerais entre pacientes autistas e indivíduos normais em regiões específicas do cérebro.

Completamos recentemente outro estudo para examinar os mecanismos moleculares de insultos exógenos ao neurodesenvolvimento humano, por meio da aplicação da metabolômica à neurogênese a partir de células tronco embrionárias (PALMER et al., 2012). A exposição pré-natal ao álcool é apontada como a principal causa de alterações no neurodesenvolvimento humano em muitos países, incluindo os Estados Unidos. Os mecanismos moleculares que levam à síndrome do álcool fetal não são completamente elucidados. Nesse estudo (PALMER et al., 2012) financiado pelo Ministério da Saúde norte-americano (*NIH, National Institutes of Health*), examinamos os efeitos de níveis de álcool maternos causais da síndrome do álcool fetal (0.1 e 0.3% de álcool sérico) sobre o neurodesenvolvimento humano em diferentes estágios (pré-precursos neurais, precursos neurais e neurônios diferenciados, a partir de duas linhagens diferentes de células-tronco embrionárias). Além de detectar alterações estatísticas em vários metabólitos durante diferentes estágios de neurodesenvolvimento humano, 16 metabólitos apresentaram perturbações dose-dependentes. A identidade química de vários metabólitos foi confirmada por MS-MS (*tandem mass spectrometry*) revelando ainda que algumas rotas metabólicas afetadas pelo álcool são também estatisticamente alteradas por outros agentes que interferem com o desenvolvimento neurológico humano, tais como o valproato. Ressaltamos aqui perturbações ao metabolismo do neurotransmissor serotonina e de seu precursor triptofano, com alterações também significativas à abundância do metabólito quinurenina, cujo papel como biomarcador diagnóstico em desordens cognitivas parece ser bastante promissor. Este foi o primeiro relato científico do possível envolvimento

da quinurenina na neurotoxicidade pré-natal exercida pelo álcool, indicando a utilidade da metabolômica para a descoberta de novos indicadores biológicos ou biomarcadores.

O estabelecimento de novos testes para prever a toxicidade de fármacos e químicos industriais para embriões humanos e a avaliação da habilidade destes compostos de induzir alterações ao desenvolvimento pré-natal (teratogênese) é uma das aplicações da metabolômica à saúde humana que têm sido foco de nosso trabalho. Infelizmente, os testes de segurança para avaliar a teratogênese de compostos nas indústrias farmacêutica e química são baseados em modelos animais, que apresentam uma correlação com efeitos teratogênicos humanos de cerca de 60%. O desenvolvimento de uma nova modalidade de testes *in vitro* baseados na metabolômica de células-tronco embrionárias oferece a possibilidade de identificar efeitos adversos de químicos a embriões humanos com maior acurácia do que modelos animais, conforme demonstrado em outros estudos publicados pela nossa equipe e nossos colaboradores (WEST et al., 2010; KLEINSTREUER et al., 2011). No artigo de West et al. (2010), identificamos uma “assinatura metabolômica” ou *fingerprnt* de pequenas moléculas que conseguiu prever a teratogênese de fármacos com aproximadamente 90% de acurácia em estudos cegos, sendo assim superior aos índices descritos para modelos animais. Este teste, chamado de DevTox®, já se encontra em fase de comercialização nos Estados Unidos, e está sendo utilizado experimentalmente por empresas do setor farmacêutico e do setor químico para examinar a toxicidade embrionária de seus compostos. Visto que é um modelo estritamente *in vitro*, que não é capaz de medir possíveis efeitos sistêmicos na toxicidade, o DevTox® não deve substituir completamente o uso de animais em estudos pré-clínicos. É, no entanto, uma alternativa mais rápida, de menor custo e de maior acurácia para o *screening* de fármacos com relação ao seu potencial toxicológico pré-natal, reduzindo efetivamente o número de animais utilizados em P&D de novos fármacos e terapias.

Vale ainda ressaltar que identificamos e validamos um novo biomarcador potencial para a teratogênese, a molécula di-metil-arginina (DMA). O DMA é um inibidor da atividade da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), cujo papel é crítico durante o desenvolvimento de mamíferos particularmente para o fechamento do tubo neural (NACHMANY et al., 2006). A falha neste processo é o principal mecanismo responsável pela severa malformação espinha bífida e a metabolômica serviu como base para o desenvolvimento de um novo teste pré-clínico e teve também uma importante aplicação na elucidação de processos biológicos que participam de insultos tóxicos (WEST et al., 2010).

Os indicadores utilizados no teste DevTox<sup>®</sup>, que governam a análise quimométrica, são essencialmente moléculas endógenas humanas e obtivemos interessante evidência inicial sobre a reprodutibilidade do teste para prever a toxicidade embrionária de químicos industriais, conforme relatado no estudo de Kleinstreuer et al. (2011). Nesse trabalho pioneiro, a metabolômica de células-tronco embrionárias foi avaliada em resposta a 11 químicos industriais do acervo químico do programa ToxCast<sup>™</sup> do EPA (*Environment Protection Agency*, Agência de Proteção Ambiental do Governo Americano). Vale notar que o design experimental adotado foi o de estudo cego, isto é, a identidade e o potencial teratogênico destes químicos industriais não foram revelados aos investigadores que executaram os tratamentos e análise de dados. A análise dos resultados demonstrou que o teste DevTox<sup>®</sup>, baseado exclusivamente no metaboloma humano, desenvolvido inicialmente para prever a teratogênese de fármacos e nunca antes “testado” em compostos químicos não terapêuticos, conseguir classificar corretamente a teratogenicidade dos químicos industriais com até 83% de acurácia. Antecipamos assim que esta plataforma poderá servir como uma ferramenta importante para prevenir malformações congênitas induzidas por químicos industriais e poluentes do meio ambiente.

## Metabolômica e a descoberta de biomarcadores aplicáveis à agricultura e à bioenergia

Apesar do foco primário de nossos esforços científicos ter sido concentrado inicialmente em saúde humana, a *Stemina Biomarker Discovery* tem avançado no uso da metabolômica como uma alternativa tecnológica para a descoberta de biomarcadores de características agrícolas de alto mérito. Recentemente utilizamos nossa plataforma de metabolômica para análise de amostras de milho em um estudo com a empresa *Pioneer Sementes do Grupo DuPont* (dados não publicados, apresentados durante o Encontro na Embrapa Agroenergia com autorização da empresa). Nesse estudo envolvendo três genótipos de *Zea mays* submetidos a diferentes tratamentos, a metabolômica foi capaz de separar corretamente as amostras de acordo com os três genótipos experimentais (que não eram de conhecimento dos investigadores visto o desenho experimental estudo cego). O reconhecimento de padrões e estratificação de acordo com *clusters* (análise de PCA) foram baseados exclusivamente nas diferenças no *fingerprint* metabolômico correspondente a cada genótipo.

As oportunidades para a metabolômica como veículo de inovação na agricultura e bioenergia são altamente promissoras essencialmente pelo aspecto chave que foi descrito no início da apresentação: as centenas e milhares de *endpoints* ou alvos medidos simultaneamente pela metabolômica não são biomarcadores alternativos, mas indicadores bioquímicos diretamente envolvidos nos fenótipos estudados. Em nenhum outro setor esta oportunidade talvez encontre aplicações tão competitivas quanto no setor de bioenergia e energias renováveis a partir de biomassa. Biocombustíveis como o biodiesel e o bioquerosene para a aviação são produtos diretos de moléculas energéticas, tais como os ácidos graxos, que por sua vez são detectadas de maneira sensível e reproduzível por metabolômica. O mesmo conceito é aplicável às moléculas energéticas, rotas e reações metabólicas envolvendo açúcares para a produção de etanol e biobutanol. Portanto, a metabolômica pode ser uma alternativa para a análise e seleção da capacidade bioenergética

de diferentes culturas, particularmente quando se busca identificar os efeitos bioenergéticos de modificações genéticas ou examinar bancos de germoplasma sob o ponto de vista funcional.

Ainda no contexto de rotas e reações metabólicas energéticas, visto que as moléculas detectadas por metabolômica são o resultado primário da atividade de enzimas, muitas delas consideradas limitantes, ou *rate limiting enzymes*, a metabolômica facilita a análise das propriedades de conversão energética de microrganismos que são utilizados diretamente em processos industriais agroenergéticos. Este importante avanço tecnológico, conhecido como engenharia metabólica, consiste na engenharia genética dos referidos microrganismos, como bactérias, leveduras, e algas fotossintéticas para a conversão de substratos energéticos. Uma das características de maior valor industrial e econômico do processo é a verificação fenotípica (atividade enzimática) resultante da engenharia metabólica, que pode ser avaliada em larga escala por meio da metabolômica.

A detecção simultânea de diferenças significativas em múltiplas rotas metabólicas como resultado de manipulação genética permite ainda a identificação de possíveis efeitos deletérios da engenharia genética à fisiologia dos microrganismos facilitando assim, a seleção de organismos mais eficientes para processos industriais específicos. Por exemplo, a metabolômica permite a identificação e seleção de microrganismos cujas enzimas e metabólitos possuem propriedades competitivas na hidrólise da lignocelulose para a produção de etanol de segunda geração.

As oportunidades para a aplicação da metabolômica como ferramenta chave na indústria da agroenergia são, portanto, altamente promissoras, não somente pela detecção direta de ácidos graxos, açúcares e todos os seus intermediários energéticos em larga escala, mas também porque esta plataforma molecular de alta resolução é aplicável a diferentes componentes dos sistemas de produção de bioenergia, tais como o teor



ou conteúdo energético, a eficiência de conversão de substratos e a biossíntese e biodisponibilidade de moléculas energéticas em uma ampla variedade de culturas agrícolas.

## Referências

- BEN-HUR, T.; IDELSON, M.; KHANER, H.; PERA, M.; REINHARTZ, E.; ITZIK, A.; REUBINOFF, B.E. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. **Stem Cells**. Dayton, v. 22, n. 7, p. 1246-1255, 2004.
- BJERKEDAL, T.; CZEIZEL, A.; GOJJARD, J.; KALLEN, B.; MATROIACOVA, P. Valproic acid and spina bifida. **Lancet**, London, v. 2, p. 109, 1982.
- CEZAR, G. G.; QUAM, J. A.; SMITH, A. M.; ROSA, G. J. M.; PIEKARCZYK, M. K.; BROWN, J. F.; GAGE, F.; MUOTRI, A. Identification of small molecules from human embryonic stem cells using metabolomics. **Stem Cells Dev**, Dayton, v. 16, n. 6, p. 869-882, 2007.
- CEZAR, G. G.; DONLEY, E. L. Stemina biomarker discovery. **Regenerative Medicine**, London, v. 3, n. 5, p. 665-669, 2008.
- FATEMI, S. H.; HALT, A. R.; STARY, J. M.; KANODIA, R.; SCHULZ, S. C.; REALMUTO, G. R. Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. **Biological Psychiatry**, New York, v. 52, n. 8, p. 805-810, 2002.
- GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature Reviews. Neuroscience**, London, v. 4, n. 12, p. 1002-1012, 2003.
- KEIRSTEAD, H. S.; NISTOR, G.; BERNAL, G.; TOTOIU, M.; CLOUTIER, F.; SHARP, K.; STEWARD, O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell

transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v. 25, n. 19, p. 4694-4705, 2005.

KLEINSTREUER, N. C.; SMITH, A. M.; WEST, P. R.; CONARD, K. R.; FONTAINE, B. R.; WEIR-HAUPTMAN, A. M.; PALMER, J. A.; KNUDSEN, T. B.; DIX, D. J.; DONLEY, E. L.; CEZAR, G. Identifying developmental toxicity pathways for a subset of ToxCast chemicals using human embryonic stem cells and metabolomics. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 257, n. 1, p. 111-121, 2011. Epub 2011 Sep 3.

LI, Y.; POWELL, S.; BRUNETTE, E.; LEBKOWSKI, J.; MANDALAM, R. Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 91, n. 6, p. 688-698, 2005.

NACHMANY, A.; GOLD, V.; TSUR, A.; ARAD, D.; WEIL, M. Neural tube closure depends on nitric oxide synthase activity. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 96, n. 1, p. 247-253, 2006. Epub 2005 Nov.

PALMER, J. A.; POENITZSCH, A. M.; SMITH, S. M.; CONARD, K. R.; WEST, P. R.; CEZAR, G. G. Metabolic biomarkers of prenatal alcohol exposure in human embryonic stem cell-derived neural lineages. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Feb 10, 2012. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2011.01732.x

PURCELL, A. E.; JEON, O. H.; ZIMMERMAN, A. W.; BLUE, M. E.; PEVSNER, J. Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. **Neurology**, Minneapolis, v. 57, n. 9, p. 1618-1628, 2001.

RASALAM, A. D.; HAILEY, H.; WILLIAMS, J. H.; MOORE, S. J.; TURNPENNY, P. D.; LLOYD, D. J.; DEAN, J. C. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. **Developmental Medicine & Child Neurology**, London, v. 47, n. 8, p. 551-555, 2005.

WEST, P. R.; WEIR, A. M.; SMITH, A. M.; DONLEY, E. L.; CEZAR, G. Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 247, n. 1, p. 18-27, 2010. Epub 2010 May 21.

WYSZYNSKI, D. F.; NAMBIAN, M.; SURVE, T.; ALSDORF, R. M.; SMITH, C. R.; HOLMES, L. B. Antiepileptic Drug Pregnancy Registry. Increased rate of major malformations in offspring exposed to valproate during pregnancy. **Neurology**, Minneapolis, v. 64, p. 961-965, 2005.

ZHANG, S. C.; WERNIG, M.; DUNCAN, I. D.; BRÜSTLE, O.; THOMSON, J. A. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 12, p. 1129-1133, 2001.

ZHANG, S. C. Neural subtype specification from embryonic stem cells. **Brain Pathology**, Zürich, v. 16, n. 2, p. 132-142, 2006.

# Bioprospecção de Biomarcadores a partir das novas plataformas “Ômicas”

---

Rodrigo R. Catharino

Hoje as novas “ômicas” constituem uma área em plena expansão. Novas plataformas “ômicas” vêm sendo criadas, como a metabolômica, lipidômica, membranômica, petroleômica e muitas outras. A elucidação estrutural e testes para avaliação preliminar de biomarcadores, bem como o uso do *fingerprinting* e *footprinting* é de inquestionável importância em todas essas plataformas (WANG et al., 2011; KADDURAH-DAOUK et al., 2008). Indubitavelmente, os avanços significativos das técnicas de ionização ESI (*Electrospray Ionization*), APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), a introdução recente do DESI (*Desorption Electrospray Ionization*) e do EASI (*Easy Ambient Sonic Spray Ionization*), bem como aumento da sensibilidade dos equipamentos estão agora contribuindo para a aplicação em “ômicas”, justamente por permitirem menor manipulação (preparação de amostras morosas) das amostras e a não geração de subprodutos ou artefatos. As análises e o controle de biomoléculas encontradas em fluidos complexos foram facilitados, sendo a chave do desenvolvimento das “ômicas” nos últimos anos (COOKS et al., 2006; SABATINE et al., 2005). Na infusão direta por *electrospray* de uma amostra de biodiesel, por exemplo, (CATHARINO et al., 2007) as substâncias da solução analítica são protonadas ou desprotonadas, formando cátions ou ânions

e cada sinal obtido no espectro é uma molécula diferente, sendo uma excelente técnica de *screening* utilizada na obtenção de *fingerprinting* e *footprinting*. A utilização de um escopo variado de fontes e analisadores disponíveis em espectrometria de massas permite, de forma simplificada, a identificação de biomarcadores de processos utilizando as “ômicas” como ferramentas básicas (SABATINE et al., 2005).

Os dados obtidos nas “ômicas” com a identificação e quantificação de biomarcadores por metodologias validadas são multivariados e, portanto difíceis de serem visualizados. O objetivo principal do processamento de dados é mostrar, com a maior clareza possível, as principais diferenças observadas nos níveis dos metabólitos presentes nas amostras a serem comparadas para descoberta de biomarcadores (HUANG et al., 2008). Com frequência, os resultados de níveis ou perfis metabólicos são apresentados em gráficos de barras, o que muitas vezes é bastante confuso, tornando-se inviável à medida em que o número de metabólitos detectados e o número de variáveis a ser comparadas aumentam. Diversos softwares, muitos deles gratuitos, estão disponíveis no mercado e na internet, os quais permitem realizar tratamentos de dados multivariados, ou seja, dados gerados a partir de uma multiplicidade de amostras que representam uma multiplicidade de variáveis. Não há um único, ou melhor método para se tratar dados multivariados. O método mais utilizado como ferramenta quimiométrica em “ômica” é a “Análise do Componente Principal” (*Principal Component Analysis*, PCA). A análise do PCA é normalmente utilizada para o processamento de informações que envolvam muitos dados, como é o caso, por exemplo, da lipidômica, em que os dados são processados a partir da matriz que pode ser composta pelo íon e a sua respectiva intensidade em ordem de significância, podendo ser agrupados os dados ou mesmo diferenciados para a escolha dos melhores biomarcadores (FARDET et al., 2008).

## Referências

CATHARINO, R. R.; MILAGRE, H. M. S.; SARAIVA, S. A.; GARCIA, C. M.; SCHUCHARDT, U.; EBERLIN, M. N. Biodiesel Typification and Quality Control by Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. **Energy and Fuels**, Washington, v. 21, p. 3698 - 3701, 2007.

COOKS, R. G.; OUYANG, Z.; TAKATS, Z.; WISEMAN, J. M. Ambient Mass Spectrometry. **Science**, Washington, v. 311, p. 1566 - 1570, 2006.

FARDET, A.; LLOACH, R.; MARTIN, J. F.; BESSON, C.; LYAN, B.; PUJOS-GUILLOT, E.; SCALBERT, A. A Liquid Chromatography-Quadrupole time-of-flight (Lc-Qtof)-based Metabolomic approach reveals new metabolic effects of catechin in rats fed high-fat diets. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 7, p. 2388 - 2398, 2008.

HUANG, J. A. Q.; WANG, G. ; ZHA, W.; YAN, B.; REN, H.; GU, S.; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; SHAO, F.; SHENG, L.; SUN, J. Global analysis of metabolites in rat and human urine based on gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 379, p. 20 - 26, 2008.

KADDURAH-DAOUK, R.; KRISTAL, B. S.; WEINSHILBOUM, R. M. Metabolomics: A Global Biochemical Approach to Drug Response and Disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 48, p. 653 - 683, 2008.

SABATINE, M. S.; LIU, E.; MORROW, D. A.; HELLER, E.; MCCARROLL, R. ; WIEGAND, R.; BERRIZ, G. F.; ROTH, F. P.; GERSZTEN, R. E. Metabolomic Identification of Novel Biomarkers of Myocardial Ischemia. **Circulation**, Baltimore, v. 112, p. 3868 - 3875, 2005.

WANG, H. Y.; CHU, X.; ZHAO, Z. X.; HE, X. S.; GUO, U. L. Analysis of low molecular weight compounds by MALDI-FTICR-MS. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 879, p. 1166 - 1179, 2011.



# Determinação da atividade de vias metabólicas a partir do perfil metabólico celular

---

*Silas Granato Villas-Bôas*

Metabolômica é uma das tecnologias ômicas mais recentes e faz uso de técnicas analíticas avançadas de alta sensibilidade e escopo para analisar compostos orgânicos de baixa massa molecular em amostras biológicas. Essa plataforma desenvolveu-se muito rapidamente nos últimos dez anos, mas os dados gerados pela metabolômica são altamente complexos e de difícil interpretação biológica, principalmente se desejarmos relacionar os níveis de metabólitos celulares com as atividades das vias metabólicas de que esses metabólitos fazem parte.

Embora tenha havido um desenvolvimento significativo na área de bioinformática, que melhorou a qualidade e a velocidade de processamento dos dados metabolômicos, ainda existem pouquíssimos métodos rápidos capazes de correlacionar níveis (absolutos ou relativos) de metabólitos com a atividade das diferentes vias metabólicas em operação na célula. Portanto, esse tipo de análise ainda depende de processos complicados, geralmente empregando o uso de modelos matemáticos em escala genômica, que nem sempre estão disponíveis para os organismos em estudo e geralmente consomem muito tempo.

Nós desenvolvemos um novo software chamado “*Pathway Activity Profiling* (PAPi)”. Esse software realiza comparações de atividade

das vias metabólicas usando perfil de metabólitos celulares obtidos pela metabolômica. O potencial e aplicação do programa PAPI foi demonstrado usando dados publicados relacionados à fisiologia da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e também foi comparado com análise de fluxo metabólico com carbono marcado usando as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

Os resultados do PAPI não só corroboraram as observações e interpretações publicadas previamente, mas também geraram novas hipóteses sobre a fisiologia da *S. cerevisiae*. Resultados de fluxos metabólicos obtidos a partir de experimentos com carbono marcado também confirmaram a atividade de importantes vias do metabolismo central de bactérias.

PAPI é de livre acesso e foi escrito em linguagem R. O *software* realiza comparações rápidas de atividade de vias metabólicas entre diferentes condições experimentais. Usando a lista de metabólitos identificados e suas respectivas abundâncias como “*input*”, o programa PAPI calcula o grau relativo de atividade para cada via metabólica, o que representa a atividade metabólica em potencial de cada via detectada numa condição experimental. PAPI também realiza análise de componentes principais e análise de variância ou *test* “*t*” para determinar se as diferenças em grau de atividade metabólica entre as diferentes condições experimentais são estatisticamente significativas. PAPI também gera gráficos comparativos mostrando vias metabólicas que estão “*up*” ou “*down-regulated*”.

O software PAPI encontra-se disponível em:

[http://www.4shared.com/file/s0uIYWlg/PAPI\\_10.html](http://www.4shared.com/file/s0uIYWlg/PAPI_10.html)

# Referências

AGGIO, R. M. B.; RUGGIERO, K.; VILLAS-BÔAS, S. G. Pathway Activity Profiling (PAPi): from the metabolite profile to the metabolic pathway activity. **Bioinformatics**, v. 26, p. 2969 – 2976, 2010.

# Aplicações da metabolômica em fisiologia molecular de plantas

---

*Adriano Nunes-Nesi*

Metabolômica é uma ciência relativamente recente que, por analogia à transcriptômica e proteômica, trata da análise dos metabólitos presentes em um organismo. Assim, a metabolômica objetiva a detecção e a quantificação de todos os metabólitos presentes em uma célula sob determinadas condições. Em função de uma gama de limitações (discutidas abaixo) a quantificação de todos os compostos químicos presentes em uma célula é uma meta extremamente difícil de ser alcançada. Todavia, a determinação do perfil metabólico, que nada mais é do que a quantificação de centenas ou potencialmente milhares de metabólitos presentes em uma célula, é atualmente possível.

Ao se comparar os custos para a obtenção de um perfil metabólico com os custos para a determinação de perfis de transcritos e de proteínas, verifica-se que a determinação do perfil metabólico é economicamente acessível a grande parte dos laboratórios. Neste contexto, a determinação de perfis metabólicos vem sendo muito utilizada como uma ferramenta de auxílio no desenho experimental. Além disso, a determinação e análise de perfis metabólicos são fundamentais na caracterização do metabolismo de um organismo em função de alterações genéticas ou ambientais, visto que nos permite rapidamente inferir sobre a atividade de enzimas

com base apenas nos níveis dos intermediários de uma via metabólica. Em adição, a identificação e quantificação de centenas ou milhares de compostos, presentes em uma célula possibilita a identificação de pontos de regulação na rede metabólica.

Considerando-se que mRNAs são transcritos a partir do DNA, proteínas traduzidas a partir dos mRNAs e os vários metabólitos são produzidos por várias atividades enzimáticas, a metabolômica representa uma progressão lógica a partir de análises em larga escala de RNAs e proteínas em nível de biologia de sistema. Em função disso, a metabolômica vem sendo amplamente empregada como uma ferramenta na análise do genoma funcional. Neste contexto, vários estudos em plantas, onde perfis de transcritos são analisados em conjunto com perfis metabólicos têm revelado que a integração da metabolômica com transcriptômica possibilita a identificação de genes importantes na regulação/controle de vias metabólicas. Assim, estas abordagens integradas são extremamente úteis na caracterização sistemática de processos biológicos, permitindo a identificação de genes ou vias metabólicas candidatos a aplicações biotecnológicas diversas.

Mesmo com os avanços obtidos com a análise de metabólitos em plantas, vários desafios ainda precisam ser superados. Entre eles estão (i) a grande quantidade de metabólitos presentes em uma célula vegetal, estimados em aproximadamente 200.000 compostos; (ii) a grande variação em concentração que podem ir de femto Molar a mili Molar, como o que ocorre geralmente com açúcares e hormônios; (iii) grande diversidade em estruturas químicas o que se reflete em variação nas propriedades químicas dos compostos e (iv) a limitada informação sobre a regulação da rede metabólica em geral. Outros fatores que dificultam ainda mais a obtenção, a análise e o entendimento de um perfil metabólico em células vegetais são: a presença de inúmeros tipos de células em um mesmo tecido e a presença de várias organelas em uma célula vegetal. Associados à alta compartimentalização subcelular, verifica-se também

que o metabolismo em uma célula vegetal é altamente complexo, em função de características como: (i) redundância de rotas metabólicas; (ii) múltiplos reservatórios de metabólitos dentro de uma mesma célula e (iii) presença de enzimas catalisando reações idênticas em organelas distintas. Adicionalmente, verifica-se que o metabolismo de uma célula vegetal é governado por um sofisticado sistema de controle espaço-temporal. Diante do exposto, pode-se afirmar que apesar dos avanços analíticos obtidos na análise de múltiplos metabólitos de uma célula vegetal, ainda é extremamente difícil modificar o metabolismo de uma maneira racional.

Durante a palestra, além do exposto acima, foram abordados alguns exemplos práticos para ilustrar a utilização de métodos de análise de perfil metabólico na caracterização de respostas metabólicas a alterações genéticas, ambientais, ecológicas e no desenvolvimento. Foram, também, utilizados exemplos nos quais a quantificação de intermediários ou produtos metabólicos ocorre em associação com abordagens de genética direta e reversa.

Em suma, pode-se afirmar que a metabolômica, apesar de relativamente recente, tornou-se um componente essencial para genômica funcional e biologia de sistemas. Cumpre ressaltar que a determinação de metabólitos e estudo de perfis metabólicos permite identificar fenótipos metabólicos em resposta a diversidade de plantas e ajustes ecofisiológicos. Salienta-se ainda que a metabolômica surge como uma ferramenta essencial para aqueles que se dispõem a investigar o metabolismo de organismos de importância para a conversão de energia solar em biomassa e combustíveis alternativos.

# Metabolic profile of sugarcane during the stage of sucrose maturation in the stem

---

*Carlos Alberto Labate*

In the last decade we have seen an extraordinary development of high-throughput methods for identifying and quantifying DNA, mRNA, proteins and metabolites which changed our view of plant metabolism. Systems Biology became a possible dream by integrating the information from genes, proteins and metabolites to study the complexity of metabolic networks, flux control and metabolic regulation. In the case of metabolomics several methods are suitable for large-scale analysis and comparison of metabolites in plants, including Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS), Direct Flow Injection Mass Spectrometry (DFI-MS), Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS), Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry (CE-MS) and NMR (Nuclear Magnetic Resonance) technologies (De Vos et al., 2007). GC-TOF-MS was the first approach used in large scale plant metabolomics, and today several protocols for sample extraction, derivatization and subsequent data analysis are described (LISEC et al., 2006). This mass spectrometry technology covers a large variety of non-volatile metabolites, mainly those involved in primary metabolism, including organic and amino acids, sugars, sugar alcohols, phosphorylated intermediates, as well as lipophilic compounds such as fatty acids and sterols. GC-TOF-MS produces highly reproducible separation and fragmentation patterns of

metabolites, which enables the use of metabolite libraries. (LISEC et al., 2006; MEYER et al., 2007). LC-MS/MS employs Q-TOF equipments which are very efficient for determining many semi-polar compounds including key secondary metabolite groups, such as alkaloids, saponins, phenolic acids, phenylpropanoids, flavonoids, glucosinolates and polyamines. These compounds are easily extracted with aqueous alcohol solutions and can be injected directly in the mass spectrometer without the need of derivatization. Many semi-polar compounds not involved in primary metabolism, have already been shown to have phenotypic/physiological importance. The identification of semi-polar metabolites by the LC-QTOF-MS can be best separated and detected if, previously to ionization, the plant extract is separated by liquid chromatography (Acquity UPLC, from Waters). A more applied view of these new technologies provides an opportunity to use metabolite fingerprinting and profiling to identify desirable traits in plants from different populations. Understanding plant metabolic pathways and the interactions between genes, phenotype, and environment is fundamental to functional genomics (WECKWERTH, 2003; OVERY et al., 2005).

Our project aims to obtain an insight into the genetic factors controlling sucrose accumulation in sugarcane, linking gene expression, proteins and metabolites data in a systems biology approach. The first part of the project we are establishing the metabolome profile and proteome from leaves, mature and immature internodes at different stages of development of the sugarcane cultivar SP80-3280. This plant material was chosen as our *model plant* as its genome will be completely sequenced by SUCEST-Genome project. Besides, this cultivar has also good agronomic properties such as high brix, high productivity, high fiber content, resistance to rust and other important diseases of sugarcane. The changes of the metabolome and proteome of the different plant tissues will be compared at different stages of development, and with particular interest during the stage of sucrose accumulation. The metabolome data banks will be built based on



metabolite profiling using two complementary mass spectrometry techniques: GC-TOF-MS and LC/MS-MS. In these initial steps we will also develop computational tools to improve mass spectrometry data analysis and annotation. Figure provides a view of the experimental flow we are following in the project.

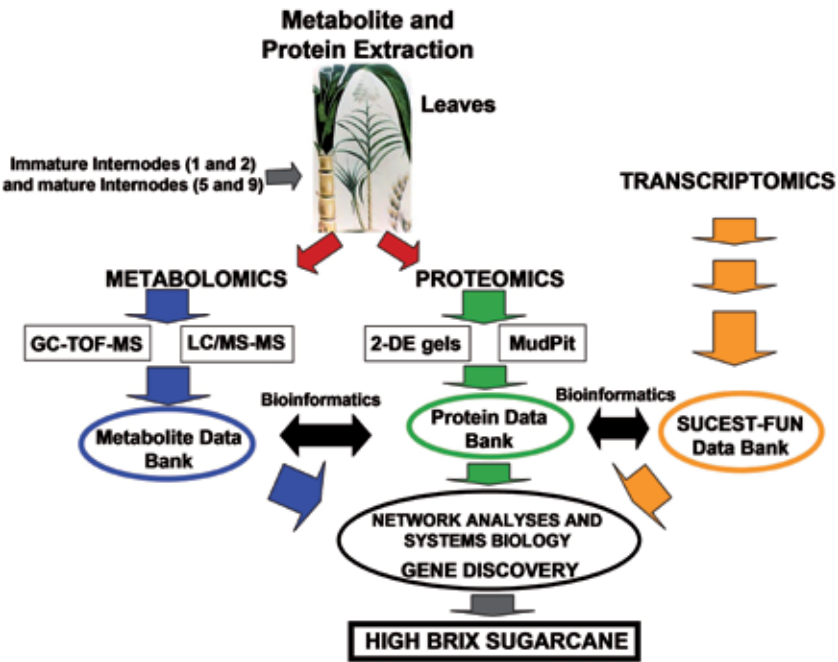


Figure. Experimental flow

## References

DE VOS, R. C. H.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J. B.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 4, p. 778 - 791, 2007.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 1, p. 387 - 396, 2006.

MEYER, R. C.; STEIFANTH, M.; LISEC, J.; BECHER, M.; HANNA WITUCKA-WALL, H.; TÖRJÉK, O.; FIEHN, O.; ECKARDT, A.; WILLMITZER, L.; SELBIG, J.; ALTMANN, T. The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington**, v. 104, n. 11, p. 4759 - 4764, 2007.

OVERY, S. A.; WALKER, H. J.; MALONE, S.; HOWARD, T. P.; BAXTER, C. J.; SWEETLOVE, L. J.; HILL, S. A.; QUICK, W. P. Application of metabolite profiling to the identification of traits in a population of tomato introgression lines. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 287 - 296, 2005.

WECKWERTH W. Metabolomics in systems biology. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 669 – 689, 2003.

Financial Support: FAPESP-BIOEN/PRONEX 2008/56100-5.

# Soluções em Espectrometria de Massas e Análise de Dados Waters em Análises Metabolômicas

---

*Amadeu Hoshi Iglesias,*

O trabalho apresentado visou apresentar as soluções de *hardware* e *software* da Waters a fim de auxiliar pesquisadores envolvidos em estudos na área de metabolômica a sobrepor os problemas inerentes a esse tipo de análise, tais como baixas quantidades de material, extensa faixa dinâmica e grande diversidade de compostos químicos de diferentes naturezas.

Uma das grandes inovações que elevou significativamente a qualidade dos dados obtidos, inicialmente introduzida pela Waters comercialmente em 2004, foi a tecnologia de UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*). Baseada na utilização de partículas sub-2  $\mu\text{m}$  e em equipamentos de baixíssimas dispersões, UPLC trouxe ao campo da metabolômica um aumento considerável na resolução da separação cromatográfica, permitindo o aumento da capacidade de picos na cromatografia, acarretando na identificação de um maior número de compostos. Aliado ao benefício do aumento da resolução está a diminuição significativa nos tempos de análise permitindo, no mesmo tempo de experimento, fazer corridas mais longas ou injeção de mais replicatas.

Com o surgimento do UPLC, fez-se necessário o desenvolvimento de equipamentos do tipo Triplo Quadrupolo para que eles tivessem

velocidade de aquisição compatíveis com a separação. Em função disso nasceu a linha de equipamentos Triplo Quadrupolos Xevo, desenvolvida para realizar as análises quantitativas mais desafiadoras ao mesmo tempo em que apresentam várias opções experimentais qualitativas. Uma das principais características dessa linha inserida no contexto de metaboloma (e extensiva à linha de equipamentos tipo Q-Tof (*Quadrupole Time of Flight*)) é o desenho da fonte de ionização universal, onde é possível trocar, facilmente, inúmeras fontes de ionização em um intervalo de tempo muito curto. Essa característica adiciona grande versatilidade aos instrumentos, uma vez que permite a ionização de moléculas bem apolares (com as fontes de APGC - *Atmospheric Pressure Gas Chromatography*, ou APPI - *Atmospheric Pressure Photoionization*), até moléculas bem polares (com as fontes de ESI - *Electrospray Ionization*, ou APCI - *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*). Além disso, esses equipamentos são dotados da cela de colisão com a tecnologia *T-Wave*, que permite a aquisição de inúmeros tipos de espectros de MS e MS/MS nos modos positivo e negativo na mesma corrida, maximizando a informação obtida em uma única injeção.

Na linha de equipamentos Q-Tof, o Xevo Q-Tof é um equipamento de bancada que permite aquisição de espectros com alta resolução e exatidão de massas, informações fundamentais para confirmação de uma molécula alvo ou identificação de um composto desconhecido. Outra inovação que aumentou as capacidades desses instrumentos foi o desenvolvimento de um novo sistema de detecção de íons para substituir os tradicionais MCPs (*Microchannel Plates*), que diminuíram consideravelmente o efeito de saturação de sinal e consequentemente estenderam a capacidade de quantificação desses instrumentos, aumentando para até 4 ordens de grandeza a linearidade. No caso de análises ainda mais desafiadoras, a linha de equipamento Synapt permite adicionar outra dimensão ortogonal na separação das espécies, a mobilidade iônica, aumentando não só a faixa dinâmica do experimento, mas possibilitando também a separação de isômeros por

tempo de difusão. Finalmente, os equipamentos dessa linha permitem também a utilização da fonte de ionização MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), possibilitando, por exemplo, experimentos de *imaging*, onde é possível analisar a presença ou a ausência de metabólitos com resolução espacial.

Um dos grandes gargalos na análise metabolômica está no processamento e na interpretação dos dados obtidos. Isso se dá em virtude do grande número de amostras e replicatas e, conseqüentemente, grande quantidade de dados obtidos mesmo em experimentos mais simples. Para minimizar essa questão, a Waters desenvolveu o *software* MarkerLynx XS que possibilita análises quimiométricas sem a necessidade de transferência e conversão de dados. Usando esse software, é possível comparar e agrupar amostras por meio de gráficos do tipo PCA (*Principal Component Analysis*) em 2 e 3 dimensões. Caso seja necessária uma análise mais aprofundada, com a determinação de marcadores, é possível utilizar análises do tipo OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis*) que permite visualmente identificar íons mais característicos para cada amostra.

Finalmente, caso os dados tenham sido obtidos em equipamentos de alta exatidão de massas é possível processá-los a fim de se encontrar a fórmula molecular e posteriormente buscar essa fórmula em bancos de dados da internet, como por exemplo, o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) ou ChemSpider.

## Conclusões e Perspectivas

---

O “Encontro sobre Metabolômica” foi um dos primeiros sobre este tema no país e reuniu cerca de 70 participantes, dentre eles, professores, estudantes e pesquisadores de organizações de vários estados do Brasil.

Apesar de ser um tema novo, principalmente no Brasil, a Metabolômica foi abordada neste evento em diferentes áreas, desde técnicas analíticas sofisticadas, até aplicações em microrganismos e em plantas, e busca por biomarcadores. Este evento contemplou tanto palestras voltadas para o público acadêmico com a apresentação de resultados promissores quanto resultados obtidos por empresas internacionais que demonstraram o potencial de produtos comerciais empregados em estudos de pesquisa, desenvolvimento e inovação com base em Metabolômica.

O Encontro contou com a participação de palestrantes nacionais e internacionais de alto nível, os quais certamente poderão contribuir com a Embrapa Agroenergia para o desenvolvimento deste tema, sendo, portanto, potenciais parceiros de alta qualidade para a Embrapa, uma instituição consolidada em pesquisa e desenvolvimento, mas que apenas recentemente iniciou trabalhos com Metabolômica.

A Comissão Organizadora do Encontro obteve uma avaliação positiva do evento, uma vez que os objetivos iniciais foram cumpridos e vários aspectos decorrentes do evento foram delineados, podendo-se citar a sugestão de alguns participantes para que a Embrapa ajude a criar a Sociedade Brasileira de Metabolômica e realize ou participe da organização do 1º Congresso Brasileiro em Metabolômica, de modo a fortalecer, no Brasil, este tema tão promissor; além disso, também se observou a articulação entre participantes, quer do setor acadêmico, quer do empresarial para o desenvolvimento de projetos em Metabolômica.

A internalização desse tema na Embrapa Agroenergia é de suma importância e propiciará maior integração entre os laboratórios temáticos da Unidade, o que poderá resultar na identificação de novas demandas e na construção de projetos com características multidisciplinares e com alto grau de competitividade. Além desta integração, o evento serviu como o marco da estruturação do grupo de Metabolômica da Embrapa Agroenergia, o que refletirá na intensa interação desta Unidade com outras Unidades Descentralizadas da Embrapa, bem como em parcerias com outras instituições externas, seja de abrangência nacional ou internacional.

A visão futura da Embrapa Agroenergia em relação ao tema é de estar inserida nesta plataforma tão promissora, com projetos estruturados na utilização da plataforma Metabolômica em microrganismos e plantas na concepção de agroenergia, especificamente em trabalhos que levem ao avanço dos combustíveis renováveis, da química verde e das biorrefinarias.

Nesse aspecto, a Embrapa Agroenergia utilizará inicialmente a ferramenta Metabolômica, baseada em espectrometria de massas, para auxiliar no programa de melhoramento genético de plantas e leveduras de potencial agroenergético, como exemplo, i) para agregar maior valor aos coprodutos e resíduos de pinhão-mansão; e ii) obter maior eficiência no processo de produção de etanol lignocelulósico.



Ministério da  
**Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

